

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C07K 11/02, A61K 37/02</p>	AI	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/00362</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Januar 1993 (07.01.93)</p>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01304</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Juni 1992 (17.06.92)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 41 20 327.5 20. Juni 1991 (20.06.91) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : EMLING, Franz [DE/DE]; Valentin-Bauer-Strasse 22, D-6700 Ludwigshafen (DE). HAUPT, Andreas [DE/DE]; Karlsbader Strasse 13, D-6370 Oberursel (DE). KLUGE, Michael [DE/DE]; Am Huebaum 3, D-6701 Kallstadt (DE). KRONER, Matthias [DE/DE]; Brucknerstrasse 25, D-6719 Eisenberg-Steinborn (DE). HAAS, Gerhard [DE/DE]; Zur Knebelhalde 10, D-7867 Wehr (DE). SCHMIDT, Ulrich [DE/DE]; Sombartstrasse 403, D-7000 Stuttgart (DE). GRIESSER, Helmut [DE/DE]; Gerteisenstrasse 38, D-7016 Gerlingen (DE). RIEDL, Bernd [DE/DE]; Liasweg 3, D-7000 Stuttgart 80 (DE).</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; Carl-Bosch-Strasse 38, D-6700 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> </div> </div>		
<p>(54) Title: NEW PEPTIDES (DIDEMNINS); THEIR PREPARATION AND THEIR USE</p> <p>(54) Bezeichnung: NEUE PEPTIDE (DIDEMNINE), IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG</p> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> <p style="margin-top: 10px;">(I)</p> </div>		
<p>(57) Abstract</p> <p>Described are peptides of formula (I), in which R¹, R², R³, R⁴, R⁵, X¹ and X² are as defined in the description, as well as their preparation. The new peptides are suitable for use in the treatment of illnesses.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es werden Peptide der Formel (I), worin R¹, R², R³, R⁴, R⁵, X¹ und X² die in der Beschreibung angegebene Bedeutung besitzen, sowie deren Herstellung beschrieben. Die neuen Peptide eignen sich zur Bekämpfung von Krankheiten.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

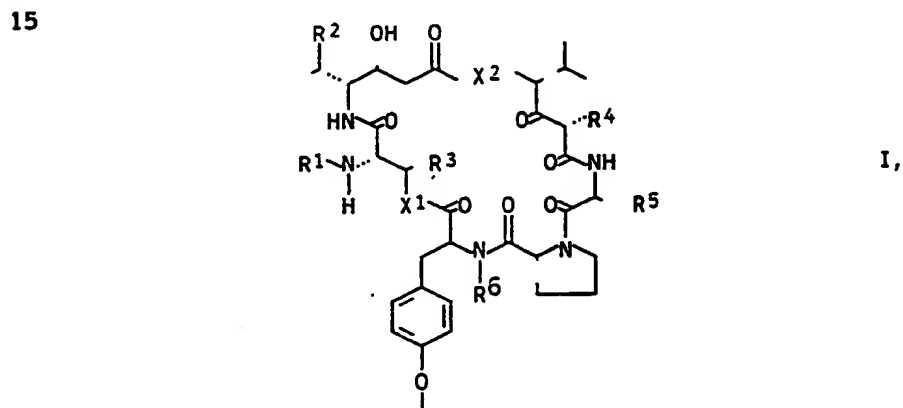
NEUE PEPTIDE (DIDEMNIN^E), IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft neue Peptide, deren Herstellung sowie deren Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.

10 Aus Tunicaten der Art *Trididemnum Solidum* und *Trididemnum Cyanophorum* sind verschiedene Verbindungen isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt worden (US 4 493 796, US 4 548 814, US 4 782 135, EP 48 149, EP 393 883), die antivirale und anti-neoplastische Wirkung besitzen.

Es wurde nun gefunden, daß Peptide der Formel I



worin

X1 ein Sauerstoffatom oder eine NH-Gruppe,

x2 ein Sauerstoffatom oder eine NH-Gruppe,

20 R¹ eine Aminoschutzgruppe, einen linearen, verzweigt-kettigen oder alicyclischen gesättigten oder ungesättigten aliphatischen, aliphatisch-aromatischen oder aromatischen Acylrest mit 1 bis 30 C-Atomen, der durch Fluor-, Nitro-, Oxo-, Hydroxy-, C₁-C₄-Alkoxy- oder eine gegebenenfalls geschützte Aminogruppe substituiert sein kann,

25 R² ein Wasserstoffatom, eine Methyl- oder Ethylgruppe,

R³ ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe,

R⁴ ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe,

R⁵ ein Wasserstoffatom oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe und

R⁶ ein Wasserstoffatom oder Methylgruppe

- bedeuten, mit Ausnahme der Verbindungen, in denen gleichzeitig X1 und X2 Sauerstoffatome, R3 und R4 Methylgruppen, R5 eine Isopropylgruppe und R1 ein geschütztes oder freies N-Me-D-Leu bedeuten,
- 5 sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren einfacher herstellbar sind und eine verbesserte Wirkung besitzen.

Der N,O-Dimethyltyrosylrest kann in dem Molekül die R- oder S-Konfiguration besitzen.

10

Von den Verbindungen der Formel I sind diejenigen bevorzugt, in denen

- X1 eine NH-Gruppe,
15 X2 eine NH-Gruppe,
R1 H, aliphatisches C₁-C₁₀-Acyl, eine urethanische Aminoschutzgruppe, ein gegebenenfalls durch Cl oder OH substituierter Benzoylrest, eine freie oder N-terminal geschützte D-Aminoacylgruppe oder der Sarcosylrest
20 R2 CH₃, C₂H₅,
R3 ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe,
R4 CH₃ und
R5 CH₂-CH(CH₃)₂ und CH(CH₃)₂
bedeuten.

25

- Als physiologisch verträgliche Säuren sind insbesondere zu nennen: Salzsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Malonsäure,
30 Schwefelsäure, L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, Brenztraubensäure, Schleimsäure, Benzoesäure, Glucuronsäure, Oxalsäure, Ascorbinsäure, Acetylglycin.

- Die neuen Verbindungen lassen sich nach bekannten Methoden
35 herstellen.

- So kann man die Verbindungen sequentiell aus Aminosäurederivaten oder durch Verknüpfung geeigneter kleiner Fragmente aufbauen. Beim sequentiellen Aufbau wird die Peptidkette bzw. Peptolidkette
40 stufenweise um jeweils ein Aminosäurederivat verlängert. Bei der

Fragmentkupplung können Fragmente unterschiedlicher Länge miteinander verknüpft werden, wobei die Fragmente ihrerseits wiederum durch sequentiellen Aufbau aus Aminosäurederivaten oder durch Fragmentkupplung gewonnen werden können. Die cyclischen Verbindungen werden nach Synthese der offenkettigen Peptide bzw. Peptolide durch eine Cyclisierungsreaktion erhalten.

Sowohl beim sequentiellen Aufbau, als auch bei der Fragmentkupplung müssen die Bausteine durch Bildung einer Amidbindung bzw. einer Esterbindung verknüpft werden. Hierzu eignen sich enzymatische und chemische Methoden.

Chemische Methoden zur Amidbindungsbildung sind ausführlich behandelt bei Müller, Methoden der Organischen Chemie Vol. XV/2, pp 1 - 364, Thieme Verlag, Stuttgart, 1974; Stewart, Young, Solid Phase Peptide Synthesis, pp 31 - 34, 71 - 82, Pierce Chemical Company, Rockford, 1984; Bodanszky, Klausner, Ondetti, Peptide Synthesis, pp 85 - 128, John Wiley & Sons, New York, 1976, und anderen Standardwerken der Peptidchemie. Besonders bevorzugt sind die Azidmethode, die symmetrische und gemischte Anhydridmethode, in situ erzeugte oder präformierte Aktivester (z.B. Cyan-thio-pyridylester) und die Amidbindungsbildung mit Hilfe von Kupplungsreagenzien (Aktivatoren), insbesondere Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIC), 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDCI), n-Propanphosphorsäureanhydrid (PPA), N,N-Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)amidophosphorsäurechlorid (BOP-Cl), Diphenylphosphorylazid (DPPA), Castro's Reagenz (BOP), O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-Salze (HBTU), 2,5-Diphenyl-2,3-dihydro-3-oxo-4-hydroxythiophendioxid (Steglich's Reagenz; HOTDO) und 1,1'-Carbonyl-diimidazol (CDI). Die Kupplungsreagenzien können allein oder in Kombination mit Additiven wie N,N'-Dimethyl-4-aminopyridin (DMAP), N-Hydroxybenzotriazol (HOBt), N-Hydroxybenzotriazin (HOObt), N-Hydroxy-succinimid (HOSu) oder 2-Hydroxypyridin eingesetzt werden.

Chemische Methoden zur Esterbindungsbildung sind ausführlich behandelt bei Müller, Methoden der Organischen Chemie Vol. E5, pp 656-773, Thieme Verlag Stuttgart, 1985). Besonders bevorzugt ist die Umsetzung von Carbonsäure und Alkohol mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und N,N-Dimethyl-4-aminopyridin (DMAP).

Während bei der enzymatischen Peptidsynthese normalerweise auf Schutzgruppen verzichtet werden kann, ist für die chemische Synthese ein reversibler Schutz der an der Bildung der Amid- bzw. Esterbindung nicht beteiligten reaktiven funktionellen Gruppen der beiden Reaktionspartner erforderlich. Bei den chemischen Peptidsynthesen werden drei literaturbekannte Schutzgruppentechniken für Amine bevorzugt: Die Benzyloxycarbonyl(Z)-, die t-Butyloxycarbonyl(Boc)- und die 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)-Schutzgruppentechnik. Für OH-Gruppen eignen sich besonders die t-Butyl-, die Benzyl-, die 2-Chloracetyl- und die t-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppen.

Die Seitenkettenschutzgruppen der trifunktionellen Aminosäurederivate bzw. Peptid- oder Peptolidbausteine werden so gewählt, daß sie nicht notwendigerweise zusammen abgespalten werden. Eine ausführliche Übersicht über Aminosäureschutzgruppen gibt Müller, Methoden der Organischen Chemie, Vol. XV/1, pp 20-906, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1974.

Die neuen Verbindungen besitzen eine sehr gute anti-virale und anti-neoplastische Wirkung und lassen sich daher gegen neoplastische Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen sowie zur Bekämpfung und Prophylaxe von Infektionen und Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen einsetzen.

Die Wirkung der neuen Verbindungen ist sehr selektiv.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in üblicher Weise oral oder parenteral (subkutan, intravenös, intramuskulär, intraperitoneal) verabfolgt werden.

Die Dosierung hängt vom Alter, Zustand und Gewicht des Patienten sowie von der Applikationsart ab. In der Regel beträgt die tägliche Wirkstoffdosis zwischen etwa 10 und 1000 mg/kg Körpergewicht bei oraler Gabe und zwischen etwa 0,1 und 35 mg/m² Körperoberfläche bei parenteraler Gabe.

Die neuen Verbindungen können in den gebräuchlichen galenischen Applikationsformen fest oder flüssig angewendet werden, z.B. als Tabletten, Filmtabletten, Kapseln, Pulver, Granulate, Dragees,

Suppositorien oder Lösungen. Diese werden in üblicher Weise hergestellt. Die Wirkstoffe können dabei mit den üblichen galenischen Hilfsmitteln wie Tablettenbindern, Füllstoffen, Konservierungsmitteln, Tabletzensprengmitteln, Fließregulierungsmitteln, Weichmachern, Netzmitteln, Dispergiermitteln, Emulgatoren, Lösungsmitteln, Retardierungsmitteln, Antioxidantien und/oder Treibgasen verarbeitet werden (vgl. H. Sucker et al: Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1978). Die so erhaltenen Applikationsformen enthalten den Wirkstoff normalerweise in einer Menge von 1 bis 90 Gew.-%.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

Beispiel 1

Herstellung der Verbindung I (R^1 = Benzyloxycarbonyl, R^2 = C_2H_5 , R^3 = CH_3 , R^4 = CH_3 , R^5 = $CH_2-CH(CH_3)_2$, X^1 =O, X^2 =O, S-Konfiguration)

o-Monochloracetyl-L-hydroxyisovaleriansäurechlorid (1)

11,8 g (0,1 mol) L-Hydroxyisovaleriansäure wurden in 50 ml CH_2Cl_2 bei $0^\circ C$ vorgelegt; dann wurden 11,3 g (0,1 mol) Chloracetylchlorid in 50 ml CH_2Cl_2 , dann 8 ml (7,9 g, 0,1 mol) Pyridin zugegeben. Man ließ mindestens 20 h bei RT stehen. Nach Verdünnen mit EE wurde mit 1 N $KHSO_4$ und Wasser gewaschen, getrocknet ($MgSO_4$) und im Vakuum.eingeengt. Man erhielt 19,8 g (0,1 mol) gelbliches Öl, das für weitere Umsetzungen genügend rein war.

Die so erhaltene chloracetylgeschützte Hydroxyisovaleriansäure (1 Äqv) wurde mit 2 Äqv. Thionylchlorid versetzt und 3 h auf $50^\circ C$ erwärmt, bis die Gasentwicklung aufhörte. Überschüssiges Reagens wurde im Vakuum entfernt. Das Säurechlorid (1) wurde destilliert. Ausbeute 79 %, Sdp. $103^\circ C/10$ Torr, $[\alpha]_D^{25} = -9,4$ ($c = 2,7$, CH_2Cl_2).

O-Monochloracetyl-(2RS,4S)-hydroxyisovalerylpropionsäure (2)

56 mmol (11,9) (1) wurden in 80 ml PE gelöst und zu einer Methylmalonesterenolatlösung bei $-60^\circ C$ getropft, die aus 49,3 ml Methylmalonsäurebis(trimethylsilyl)ester in 220 ml THF und 120 ml

1,6 N BuLi (gegen den Indikator Benzylidenbenzylimin) zuvor bei -60°C hergestellt wurde. Über Nacht ließ man auf RT kommen, hydrolysierte mit 100 ml 2 N KHSO₄ bis zur sauren Reaktion und extrahierte 4 mal mit Ether, alle organischen Phasen wurden
5 getrocknet (MgSO₄) und im Vakuum eingengt. Der verbleibende Sirup wurde in 100 ml Toluol aufgenommen, 2 h gerührt und von unlöslicher Methylmalonsäure abfiltriert, die mit 50 ml Toluol nachgewaschen wurde. Der Toluolextrakt wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung 3 mal (100, 50, 50 ml) intensiv extrahiert; die
10 vereinigten wäßrigen Phasen 1 mal mit 50 ml Toluol gewaschen, mit 80 ml CHCl₃ unterschichtet und mit festem KHSO₄ vorsichtig (Aufschäumen!) angesäuert. Die wäßrig-saure Phase wurde noch 2 mal mit je 80 ml CHCl₃ extrahiert, die organische Phase getrocknet (MgSO₄) und im Vakuum eingengt. Man erhielt ein geruchloses,
15 farbloses Öl.

Ausbeute: 11,2 g (44,8 mmol, 80 %).

Die β -Ketosäure ist etwa 85 bis 90 % rein und wurde unverzüglich weiterverarbeitet. Eine Lagerung ist auch in der Kälte nicht unbegrenzt möglich.

20 ¹H-NMR (80 MHz, CDCl₃): δ = 9,3 (s, 1H), 5,35 (d, J = 4Hz, 0,6H), 5,25 (d, J=4Hz, 0,4H), 4,2 (s, 2H), 3,5-4,0 (m, 1H), 2,0-2,5 (m, 1H), 1,4 (d, J=6Hz, 3H), 1,35 (d, J=7Hz, 3H), 1,0 (m, 6H).

25 o-Monochloracetyl-(2RS,4S)-hydroxyisovalerylpropionyl-L-leucin-trichlorethylester (3)

12,8 g (51,1 mmol) (2) wurden mit 12,7 g (51,1 mmol) L-Leucin-trichlorethylester in 100 ml CH₂Cl₂ gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 10,5 g (51,1 mmol) festem DCCD versetzt. Nach 2 h bei 0°C
30 wurde vom Harnstoff abfiltriert, eingedampft und mit PE/EE 7/3 chromatographiert. Man erhielt 14,0 g (28,3 mmol, 56 %) sauberes Produkt, das nach 2 Tagen fest wurde. Eine Probe konnte aus Diethylether/PE sehr langsam umkristallisiert werden. Fp. 71-95°C
(Diastereomerenmischung).

35

40

(2RS,4S)-Hydroxyisovalerylpropionyl-L-leucintrichlorethylester
(4)

7,00 g (14,1 mmol) (3) wurden in 70 ml Dioxan gelöst und nacheinander mit 2,14 ml (15 mmol) Triethylamin und 2,22 g (15 mmol) Pentamethylen-thioharnstoff versetzt und 3 h auf 70°C erwärmt. Danach wurde im Vakuum eingeeengt, in EE aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Das verbleibende, leicht gelbe Öl wurde mit PE/EE 7/3 über eine kurze Kieselgelsäule filtriert, die erhaltene Kristallmasse in 65 ml Ether gelöst, mit 190 ml PE versetzt und im offenen Kolben stehengelassen. Durch sehr langsame, fraktionierende Kristallisation erhielt man farblose Nadelchen vom Schmp. 101-103°C. Ausbeute: 4,6 g (11 mmol, 78 %).

15 Boc-(3S,4R,5S)-Isostatin (TBDMS)-OH (5)

a) 7,0 g (25,3 mmol) Boc-(3S,4R,5S)-Isostatin-OH (Synthesis (1989), No. 11, 832-835) wurde in 80 ml DMF gelöst. Zu der gekühlten Lösung gab man 11,1 g (163 mol) Imidazol und 10,6 g (70,3 mmol) TBDMS-Cl. Die Mischung wurde 30 min bei RT belassen. Nach Zugabe von 1,2 l EE wurde die Reaktionsmischung schnell mit 1N KHSO₄ (200 ml), und viermal mit Wasser (4 x 150 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und zur Trockne eingedampft.
25 Ausbeute: 12,2 g (25,3 mmol), Öl
[α]_D²⁰ = +7,7° (c = 3,7, CHCl₃).

b) Das bissilylierte Produkt (12,2 g, 25,3 mmol) wurde in 200 ml Dioxan gelöst und tropfenweise mit 1N NaOH (26 ml) versetzt, bis der pH-Wert der Lösung alkalisch blieb. Dioxan wurde abgedampft, der Rückstand mit 200 ml EE versetzt und bei 0°C unter starkem Rühren 30 ml 1N HCl zugegeben. Die wäßrige Phase wurde mit EE (2 x 100 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und zur Trockne eingedampft.
35

Ausbeute: 9,9 g (25,3 mmol), Öl
[α]_D²⁰ = + 1,74 (c = 2,64, CHCl₃)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-tert.-butyldimethylsilyl-(3S,4R,5S)-isostatyl-(2RS,4S)-hydroxyisovalerylpropionyl-L-leucintrichlorethylester (6)

- 5 580 mg (1,49 mmol) (5) wurden mit 630 mg (1,50 mmol) (4) und 20 mg DMAP in 3 ml CH₂Cl₂ gelöst und bei -30°C mit 310 mg (1,49 mmol) DCCD in 2 ml CH₂Cl₂ versetzt. Man ließ über Nacht auf RT langsam erwärmen, verdünnte mit Diethylether und filtrierte vom Harnstoff ab. Die organische Lösung wurde schnell wie üblich
10 gewaschen und das verbleibende Öl über eine kurze Kieselgelsäule mit PE/EE 8/2 filtriert.
Ausbeute: 1,11 g (1,40 mmol, 94 %) farbloses Öl, R_f (PE/EE 8/2) = 0,6 (Doppelfleck).

- 15 C₃₅H₆₃N₂O₉Cl₃Si (790,33) Ber. C 53,19 H 8,03 N 3,54 Cl 13,46
Gef. C 53,31 H 8,11 N 3,54 Cl 13,23

(3S,4R,5S)-Isostatyl-(2RS,4S)-hydroxyisovalerylpropionyl-L-leucintrichlorethylester-hydrochlorid (7)

- 20 2,0 g (2,53 mmol) (6) wurden in 10 ml Acetonitril gelöst und mit 2 ml wäßriger Flußsäure (ca. 50 %ig) versetzt. Man rührte 4 h bei RT, neutralisierte mit festem Kalilumhydrogencarbonat und extrahierte 3 mal mit Chloroform, trocknete die organischen Extrakte
25 (MgSO₄) und dampfte im Vakuum schnell ein. Der Rückstand wurde unverzüglich bei 0°C in 20 ml HCl/Dioxan aufgenommen und 1 h bei RT gerührt. Man engte ein, dampfte 3 mal mit Methylenchlorid ab und trocknete im Hochvakuum. Ausbeute: 1,55 g (2,53 mmol, quant.).

- 30 N-Benzoyloxycarbonyl-L-threoninphenacylester (8)

- 25,3 g (0,1 mol) L-Threonin wurden in 200 ml EE suspendiert und mit 14 ml (0,1 mol) Triethylamin versetzt. Unter Rühren trug man
35 19,0 g (0,1 mol) festes ω-Bromacetophenon in einer Portion ein und erhielt zunächst eine klare Lösung, die bald trüb wurde. Man ließ 2 d stehen, verdünnte mit 500 ml EE und arbeitete wie üblich auf. Der kristalline Rückstand wurde in 420 ml Isopropanol in der Wärme gelöst, mit 300 ml warmem Wasser versetzt und 2 d im

Dunkeln stehengelassen. Die ausgefallenen weißen, langen Nadeln wurden abfiltriert, nachgewaschen und an der Luft im Dunkeln getrocknet.

- 5 Ausbeute: 27,8 g (0,075 mol, 75 %), Fp 129–130°C,
[α]_D²⁵ = –32,2 (c = 2,04, EE)

N-Boc-L-N,O-Dimethyltyrosin (9)

- 10 6,0 g NaH-Suspension wurden 3 mal mit PE gewaschen und abdekantiert, mit 50 ml THF übergossen und auf 0°C gekühlt. Dann tropfte man 32 mmol Boc-Tyrosin, gelöst in 110 ml THF, langsam zu und versetzte anschließend mit 16 ml Methyljodid. Die Suspension wurde 25 h unter Lichtausschluß bei RT gerührt, mit 50 ml EE
- 15 versetzt und mit Wasser vorsichtig hydrolysiert. Man engt im Vakuum auf ein kleines Volumen ein, überschichtet mit EE und säuert mit 2 N KHSO₄ an. Nach Extraktion mit EE werden die organischen Phasen mit 10 %iger Natriumthiosulfatlösung gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und im Vakuum eingedampft. Ausbeute: 95 %.
- 20 ¹H-NMR (80 MHz, CDCl₃): δ = 8,5 (s, 1H), 7,2 (d, 2H), 6,9 (d, 2H), 4,7 (m, 1H), 3,8 (s, 3H), 3,2 (m, 2H), 2,75 (s, 3H), 1,4 (s, 9H)

- 25 O-(tert.-Butyloxycarbonyl-L-N,O-dimethyltyrosyl)-N-benzyloxycarbonyl-L-threonin-phenacylester (10)

- 2,00 g (5,38 mmol) (8), 1,67 g (5,4 mmol) (9) und 70 mg (0,54 mmol) DMAP wurden in 20 ml CH₂Cl₂ gelöst, auf –30°C gekühlt und mit 1,13 g (5,5 mmol) DCCD versetzt. Man ließ über Nacht auf
- 30 RT kommen, filtrierte den Harnstoff ab, engte das Filtrat ein, nahm den Rückstand in Ether auf, ließ 1 h stehen und filtrierte erneut vom Harnstoff ab. Durch eine Kieselgelfiltration mit PE/EE 7/3 erhielt man das genügend reine Peptolid (10).
- 35 Ausbeute: 3,5 g (5,28 mmol, 98 %),
[α]_D²⁰ = –28,7 (c = 0,96, CHCl₃)

O-(L-N,O-Dimethyltyrosyl)-N-benzyloxycarbonyl-L-threoninphenacyl-
ester (11)

- 3,5 g (5,28 mmol) (10) wurden mit 20 ml 5 N HCl/Dioxan bei 0°C
5 gelöst und nach 10 min weitere 2 h bei RT stehengelassen. Das
Dioxan wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig EE ge-
löst, zu 200 ml Diethylether unter starkem Rühren langsam zuge-
tropft und noch 2 h weitergerührt. Der Niederschlag wurde abge-
saugt und im Vakuum getrocknet.
10 Ausbeute: 2,80 g (4,67 mmol, 88 %).

$C_{31}H_{35}N_2O_8Cl$ (599.08) Ber. C 62,15 H 5,89 N 4,67
Gef. C 61,56 H 5,99 N 4,59

- 15 Das so erhaltene Produkt wurde in 30 ml Chloroform gelöst und mit
20 ml 1 N $KHCO_3$ geschüttelt. Die wäßrige Phase wurde noch 2 mal
mit Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen
getrocknet ($MgSO_4$) und im Vakuum eingedampft.
Ausbeute: 2,45 g (4,35 mmol, 93 %) farbloser Schaum, R_f (PE/EE
20 1/1) = 0,2.

O-(tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-N,O-dimethyltyrosyl)-N-
benzyloxycarbonyl-L-threoninphenacyl-ester (12)

- 25 2,35 g (4,18 mmol) (11) und 0,94 g (4,38 mmol) Boc-Prolin werden
in 6 ml Methylenchlorid gelöst und bei -20°C mit 1,19 g (1,6 ml,
9,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin und 1,17 g (4,6 mmol) BOP-Cl
versetzt und langsam über Nacht auf RT erwärmt. Nach Verdünnen
mit Methylenchlorid wurde wie üblich aufgearbeitet und mit PE/EE
30 4/6 über eine kurze Kieselgelsäule filtriert.
Ausbeute: 3,02 g (3,97 mmol, 95 %), R_f (PE/EE 1/1) = 0,4

$C_{41}H_{47}N_3O_{11}$ (757.85) Ber. C 64,81 H 6,50 N 5,53
Gef. C 64,71 H 6,53 N 5,46

O-(tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-N,O-dimethyltyrosyl)-N-benzyloxycarbonyl-L-threonin (13)

- 2,80 g (3,68 mmol) (12) wurden in 20 ml 90 %iger wäßriger Essigsäure mit 1,8 g Zinkpulver 4 h bei RT gerührt; vom ungelösten Zink wird abfiltriert und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde zwischen EE und 1 N KHSO₄ verteilt. Die kombinierten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄) und im Vakuum eingeeengt. Das verbleibende Harz wurde 3 mal mit Toluol im Vakuum abgedampft. Dann wurde in 10 ml 1 N KHCO₃ aufgenommen, 2 mal mit Ether gewaschen und die Etherphasen 2 mal mit H₂O zurückgewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit EE überschichtet und unter Kühlung mit 1 N KHSO₄ angesäuert. Es wurde noch 2 mal mit EE ausgezogen und die vereinigten organischen Lösungen getrocknet (MgSO₄) und im Vakuum eingedampft. Ausbeute: 2,25 g (3,5 mmol, 95 %).

- O-(tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-N,O-dimethyltyrosyl)-N-benzyloxycarbonyl-L-threonyl-(3S,4R,5S)-isostatyl-(2RS,4S)-hydroxyisovalerylpropionyl-L-leucintrichlorethylester (14)

- 1,55 g (2,53 mmol) (7) und 1,79 g (2,78 mmol) (13) wurden in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst, auf 0°C gekühlt, 708 mg (2,78 mmol) BOP-Cl und 1,15 g (1,55 ml, 8,9 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin zugegeben und über Nacht langsam auf RT erwärmt. Nach Verdünnen mit Methylenchlorid wurde wie üblich aufgearbeitet. Durch Kieselgelfiltration mit PE/EE 1/1 erhielt man 2,43 g (2,02 mmol, 80 %) Hexapeptolid (14).

- MS (Fd, 50°C): 1198 (M+1)

C₅₇H₈₂N₅O₁₆ (1199,66) Ber. C 57,06 H 6,89 N 5,84 Cl 8,86
Gef. C 57,30 H 6,82 N 5,65 Cl 8,72

35

40

O-(tert.-Butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-N,O-dimethyltyrosyl)-N-benzyloxycarbonyl-L-threonyl-(3S,4R,5S)-isostatyl-(2RS,4S)-hydroxyisovalerylpropionyl-L-leucin (15)

- 5 690 mg (0,57 mmol) Trichlorethylester (14) wurden in 20 ml 90 %iger wäßriger Essigsäure gelöst und mit 2 g Zinkpulver über Nacht gerührt. Man filtrierte ab und engte das Filtrat im Vakuum ein. Der Rückstand wurde in EE aufgenommen und mit 1 N KHSO₄ und Wasser gewaschen. Die organischen Phasen wurden getrocknet
10 (MgSO₄) und im Vakuum eingedampft. Der verbleibende Rückstand wurde 3 mal mit Toluol im Vakuum abgedampft. Ausbeute: 610 mg (0,57 mmol) Harz.

- Cyclo-[N-benzyloxycarbonyl-O-[[N-[(2S,3S,4S)-4-[(3S,4R,5S)-4-amino-3-(hydroxy)-5-methylheptanoyl]oxy-3-(hydroxy)-2,5-dimethylhexanoyl]-L-leucyl]-L-prolyl-N,O-dimethyl-L-tyrosyl]-L-threonyl]
15 (17)

a) Herstellung des Pentafluorphenylesters (16)

- 20 106 mg (0,1 mmol) Hexapeptolidsäure (15) und 22,1 mg (0,12 mmol) Pentafluorphenol wurden in 0,5 ml CH₂Cl₂ bei -20°C mit 22,6 mg (0,11 mmol) DCCD in 0,1 ml CH₂Cl₂ versetzt. Man ließ über Nacht auf RT kommen. Für die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe wurde
25 diese Lösung ohne weitere Behandlung verwendet.

b) Ringschluß

- 0,1 mmol Pentafluorphenylester (16) wurden auf 1 ml mit Methylenchlorid verdünnt. Bei 0°C wurden dann 0,5 ml Trifluoressigsäure zugespritzt und 3 h bei 0°C gehalten. Lösungsmittel und überschüssige Säure wurden im Vakuum abgezogen und der verbleibende Rückstand in 200 ml Chloroform gelöst.
30

- 35 Diese Lösung wurde in einem Schütteltrichter vorgelegt und mit 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung 5 min kräftig geschüttelt. Man ließ noch 1 h stehen, trennte die Chloroformschicht ab und wusch die wäßrige Phase noch 3 mal mit je 30 ml Chloroform nach. Die organischen Lösungen wurden getrocknet
40 (MgSO₄) und im Vakuum eingengt. Durch Chromatographie mit PE/EE 35/65 wurden die epimeren Ringe getrennt.

Ausbeute: 48 mg (0,051 mmol, 51 %) (2S)-Hip-Epimeres; 23 mg (0,024 mmol, 24 %) (2R)-Hip-Epimeres.

(2S)-Hip-Epimeres $[\alpha]_D^{25} = -147,5$ (c = 0,72, EE)

MS: 950 (M+1, 24 %)

5 $C_{50}H_{71}N_5O_{13}$ (950.14) Ber. C 63,21 H 7,53 N 7,37
Gef. C 63,13 H 7,55 N 7,32

Beispiel 2

10 Cyclo-[N-hexanoyl-O-[[N-[(2S,3S,4S)-4-[(3S,4R,5S)-4-amino-3-(hydroxy)-5-methylheptanoyl]oxy-3-(hydroxy)-2,5-dimethyl-hexanoyl]-L-leucyl]-L-prolyl-N,O-dimethyl-L-tyrosyl]-L-threonyl] (18)

550 mg (0,158 mmol) (17) wurden in 40 ml 90 %iger wäßriger Essigsäure gelöst, mit 1,1 ml 1 N HCl versetzt und mit 150 mg Pd/C unter Normaldruck 6 h hydriert. Danach wurde wie üblich gearbeitet und der Rückstand 2 mal mit 5 ml Toluol im Vakuum abgedampft. Das Hydrochlorid blieb als weißes Pulver zurück. Nach der Hydrierung erhielt man in jedem Fall das stabilere (2S)-Hip-Epimere.

Eine Lösung von 500 mg des so erhaltenen Hydrochlorids (0,58 mmol) in 10 ml absolutem CH_2Cl_2 wurde bei $-10^\circ C$ mit 0,09 ml Hexansäurechlorid (0,65 mmol) und 0,33 ml Collidin (2,5 mmol) versetzt. Der Ansatz wurde 2 h bei $-10^\circ C$ und 1 h bei RT gerührt. Das CH_2Cl_2 wurde im Vakuum abgezogen, der Rückstand in EE gelöst und mit 1 N H_2SO_4 - und N $KHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit $MgSO_4$ getrocknet und eingeengt. Umkristallisation des Rückstandes aus EE/PE 1:1 ergab 400 mg reines (18). Das Filtrat wurde eingeengt und durch MPLC (EE/PE 7/3) gereinigt. Gesamtausbeute: 480 mg = 90 %.

Analog Beispiel 1 und 2 lassen sich folgende Verbindungen I herstellen:

A: $X^1 = O$, $X^2 = O$, $R^2 = C_2H_5$, $R^3 = CH_3$, $R^4 = CH_3$,
 $R^5 = CH_2-CH(CH_3)_2$ S-Konfiguration

Nr.	R^1
3	CH_3-CO
4	$H-CO$
5	CH_3-CH_2-CO
6	$CH_3-(CH_2)_{14}-CO$
7	Z
8	BOC
9	CH_3-CH_2-O-CO
10	$Z-N-Me-D-Ala-$
11	$p-OH-Benzoyl$
12	$(CH_3)_3C-CO$
13	$HO-(CH_2)_3-CO$
14	C_6H_5-O-CO
15	CF_3-CO
16	$(CF_3)_2-CH-O-CO$
17	$CH_3-CH_2-O-CO-(CF_2)_2-CO$
18	$p-HO-C_6H_4-(CH_2)_2-CO$
19	$CH_3-CO-CH_2-CO$
20	CF_3-CH_2-O-CO
21	Ac-Sarcosyl

B: $X^1 = O$, $X^2 = O$, $R^2 = C_2H_5$, $R^3 = CH_3$, $R^4 = CH_3$,
 $R^5 = CH_2-CH(CH_2)_2$ R-Konfiguration

Nr.	R^1
22	n-Hexanoyl
23	Ac-N-Me-D-Leu

C: $X^1 = O$, $X^2 = O$, $R^2 = CH_3$, $R^3 = CH_3$, $R^4 = CH_3$,
 $R^5 = CH_2-CH(CH_3)_2$ S-Konfiguration

Nr. R^1
 24 CH_3-CO
 25 $CH_3(CH_2)_4CO$
 26 Naphthyl-1-sulfonyl
 27 $H-CO$
 28 CH_3-CH_2-CO
 29 $CH_3-(CH_2)_{14}-CO$
 30 Z
 31 BOC
 32 CH_3-CH_2-O-CO
 33 Z-N-Me-D-Ala
 34 Ac-Sarcosyl
 35 p-HO-Benzoyl
 36 $(CH_3)_3C-CO$
 37 $HO-(CH_2)_3-CO$
 38 C_6H_5-O-CO
 39 CF_3-CO
 40 $(CF_3)_2CH-O-CO$
 41 $CH_3-CH_2-O-CO-(CF_2)_2-CO$
 42 p-HO-C₆H₄-(CH₂)₂-CO
 43 $CH_3-CO-CH_2-CO$
 44 CF_3-CH_2-O-CO

D: $X^1 = O$, $X^2 = O$, $R^2 = CH_3$, $R^3 = CH_3$, $R^4 = CH_3$,
 $R^5 = CH_2-CH(CH_3)_2$ R-Konfiguration

Nr. R^1
 45 CH_3-CO
 46 $CH_3-(CH_2)_4-CO$
 47 $(CH_3)_2CH-CO$
 48: $X^1 = O$, $X^2 = O$, $R^1 = Z-N-Me-D-Leu$, $R^2 = C_2H_5$
 $R^3 = CH_3$, $R^4 = H$, $R^5 = CH_2-CH(CH_3)_2$, S-Konfiguration

Beispiel 49

Herstellung der Verbindung I (R^1 = Benzyloxycarbonyl, R^2 = C_2H_5 ,
5 R^3 = CH_3 , R^4 = CH_3 , R^5 = $CH_2-CH(CH_3)_2$, X^1 = NH, X^2 = O, S-Konfiguration)

α N-Benzyloxycarbonyl- β N-[tert.-butyloxycarbonyl-L-N,O-dimethyl-tyrosyl]-(2S,3R)-diaminobuttersäuremethylester (19)

- 10 6 mmol (1,82 g) HCl·Z-Dab-OMe (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 689 (1973) wurden zwischen EE und $NaHCO_3$ -Lösung verteilt und die wäßrige Phase wurde noch zweimal mit EE extrahiert. Man trocknete die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat, dampfte ein, löste zusammen mit 6,3 mmol (1,95 g) Boc-N,O-di-
- 15 methyl-L-tyrosin in 15 ml Dichlormethan und versetzte bei $-20^\circ C$ mit 6,3 mmol (1,30 g) DCCD.

- Nachdem über Nacht auf RT erwärmt worden war, verdünnte man mit reichlich Diethylether, filtrierte und dampfte ein. Der Rückstand
- 20 wurde erneut in Ether aufgenommen, 1 h stehengelassen, filtriert und eingedampft. Kieselgelfiltration und Mitteldruckchromatographie (PE/EE = 1/1) ergaben 3,04 g (91 %) farblosen Schaum.

- Fp.: $46-48^\circ C$; $[\alpha]_D^{25} = -2,3$ ($c = 1,1$; $CHCl_3$);
- 25 DC (PE/EE = 1/1): $R_f = 0,33$; HPLC (Hex/EE = 1/1): $t_R = 3,6$ min;

α N-Benzyloxycarbonyl- β N-[tert.-butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-N,O-dimethyltyrosyl]-(2S,3R)-diaminobuttersäuremethylester (20)

- 30 4,8 mmol (2,68 g (19) wurden in 5 ml Dichlormethan gelöst, mit 10 ml HCl/Dioxan versetzt und 1 h bei RT gerührt. Danach dampfte man ein, nahm in EE auf und schüttelte mit $NaHCO_3$ -Lösung kräftig durch. Die wäßrige Phase wurde noch zweimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat
- 35 getrocknet, filtriert und eingedampft.

- Den hierbei erhaltenen farblosen Schaum löste man zusammen mit 5 mmol (1,08 g) Boc-L-prolin in 15 ml Dichlormethan und versetzte bei $-20^\circ C$ zuerst mit 5 mmol (1,27 g) Bop-Cl und dann mit 11 mmol
- 40 (1,42 g) Ethyldiisopropylamin.

Man ließ über Nacht auf RT erwärmen, arbeitete wie üblich auf und filtrierte über Kieselgel. Nach Mitteldruckchromatographie (PE/EE = 4/6) erhielt man 2,77 g (88 %) farblosen Schaum.

- 5 $[\alpha]_D^{25} = -55,1$ ($c = 1,0$; CHCl_3); DC (PE/EE = 4,6): $R_f = 0,3$; HPLC (Hex/EE = 4/6: $t_R = 4,8$ min;

α N-Benzyloxycarbonyl- β -N-[tert.-butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-N,O-dimethyltyrosyl]-(2S,3R)-diaminobuttersäure (21)

10

Zu 3,5 mmol (2,29 g (23) in 15 ml Dioxan/Wasser (2:1) wurden 4 ml 1N-NaOH unter pH-Kontrolle ($\text{pH} < 10$) langsam zugetropft. Nach weitgehendem Umsatz (DC-Kontrolle) wurde das Dioxan im Vakuum entfernt und die wäßrige Phase zweimal mit Diethylether extrahiert. Aus der Etherphase konnte gegebenenfalls unumgesetzter Ester zurückerhalten werden, während die Wasserphase mit EE überschichtet und bei 0°C mit festem Kaliumhydrogensulfat auf pH 1 bis 2 angesäuert wurde. Nach mehrfacher Extraktion mit EE, Trocknung der organischen Phasen mit Magnesiumsulfat und Abdampfen des Lösungsmittels erhielt man die entsprechende Carbonsäure.

20

Ausbeute: 2,1 g (93,7 %) farbloser, amorpher Feststoff;

- 25 α N-Benzyloxycarbonyl- β -N-[tert.-butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-N,O-dimethyltyrosyl]-(2S,3R)-diaminobutyryl-(2S,4R,5S)-isostatyl-(2RS,4S)-oxyisovalerylpropionyl-L-leucintrichlorethylester (22)

- 30 1,1 mmol (705 mg) (21) und 1,1 mmol 674 mg (7) wurden in 8 ml Dichlormethan gelöst, bei 0°C mit 1,1 mmol (280 mg) Bop-Cl und 3,4 mmol (440 mg) Ethyldiisopropylamin versetzt und über Nacht auf RT erwärmt. Nach üblicher Aufarbeitung und Mitteldruckchromatographie (PE/EE = 3/7) erhielt man 570 mg (43 %) farblosen Schaum.

- 35 DC (PE/EE = 3/7): $R_f = 0,32$; HPLC (Hex/EE = 3/7): $t_R = 3,1$ min;

40

α N-Benzyloxycarbonyl- β -N-[tert-butyloxycarbonyl-L-prolyl-L-N,O-dimethyltyrosyl]-(2S,3R)-diaminobutyryl-(2S,4R,5S)-isostatyl-(2RS,4S)-oxyisovalerylpropionyl-L-leucin (23)

- 5 0,475 mmol Trichlorethylester (22) wurden in 20 ml 90 %iger wäßriger Essigsäure gelöst und über Nacht mit 2 g Zinkpulver (frisch mit Salzsäure angeätzt und mit Wasser, Ethanol und Ether gewaschen) kräftig gerührt.
- 10 Nach Filtration zog man die Essigsäure im Ölpumpenvakuum ab, nahm den Rückstand in EE auf, wusch mit 10 %iger Zitronensäure, trocknete mit Magnesiumsulfat, filtrierte und engte ein. Zur vollständigen Entfernung der Essigsäure wurde der Rückstand noch zweimal mit Toluol eingedampft und im Hochvakuum getrocknet.
- 15 Ausbeute: 453 mg (89,3 %) farbloser Feststoff;
- 20 Cyclo-[N α -benzyloxycarbonyl-N β -[[N-[(2S,3S,4S)-4-[(3S,4R,5S)-4-amino-3-(hydroxy)-5-methylheptanoyl]oxy-3-(hydroxy)-2,5-dimethylhexanoyl]-L-leucyl]-L-prolyl-N,O-dimethyl-L-tyrosyl]-(2S,3R)-diaminobutyryl] (24)
- 0,374 mmol (400 mg) Hexapeptolidsäure werden nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift für den Ringschluß umgesetzt.
- 25 a) Darstellung des Pentafluorphenylesters und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe
- 30 400 mg (23) (0,374 mmol) und 0,56 mmol Pentafluorphenol wurden in 2 ml Dichlormethan bei -20°C mit 0,45 mmol DCCD versetzt und über Nacht auf RT erwärmt. Es wurde filtriert und eingengt, direkt bei 0°C mit 1 ml Trifluoressigsäure versetzt und 1 bis 4 h gerührt. Die Trifluoressigsäure wurde dann im Hochvakuum entfernt und das erhaltene Harz für den Ringschluß eingesetzt. Beide
- 35 Reaktionsschritte konnten im DC auf vollständigen Umsatz überprüft werden.

b) Ringschluß

Das bei der Boc-Abspaltung erhaltene Harz (0,37 mmol) wurde in 400 ml trockenem Chloroform aufgenommen und 5 min mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung kräftig geschüttelt. Man ließ 1 h stehen und extrahierte dann die wäßrige Phase noch zweimal mit Chloroform. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft.

Zur Abtrennung von Dicyclohexylharnstoff nahm man in abs. Diethylether auf, ließ 1 h stehen und filtrierte über eine wattergefüllte Pasteurpipette.

Pentafluorphenol wurde durch Kieselgelfiltration mit Dichlormethan abgetrennt. Das Produkt blieb auf dem Kieselgel haften und konnte anschließend mit EE eluiert werden. Die endgültige Reinigung erfolgte dann durch Mitteldruckchromatographie.

Nach Mitteldruckchromatographie (PE/EE = 35/65) erhielt man 150 mg (42,2 %) farblosen Feststoff.

DC (PE/EE = 35/65): $R_f = 0,34$; Fp.; 112°C ;
 $[\alpha]_D^{25} = -165,3$ ($c = 0,9$; CHCl_3); MS: 948,4 (M), 949,4 (M+H);

Cyclo-[N $^{\alpha}$ -[Z-N-Me-D-leucyl]-N $^{\beta}$ -[[N-[(2S,3S,4S)-4-[(3S,4R,5S)-4-amino-3-(hydroxy)-5-methylheptanoyl]oxy-3-(hydroxy)-2,5-dimethylhexanoyl]-L-leucyl]-L-prolyl-N,O-dimethyl-L-tyrosyl]-(2S,3R)-diaminobutyryl] (25)

0,084 mmol (24) wurden in 10 ml 90 %iger wäßriger Essigsäure mit 200 μl 1N-HCl und 30 mg Pd/C bei RT und 1 bar 6 h hydriert (DC-Kontrolle).

Abfiltrieren des Katalysators, Abziehen der Essigsäure im Vakuum und zweimaliges Eindampfen mit Toluol ergibt das Cyclopeptolidhydrochlorid in quantitativer Ausbeute.

Das Cyclopeptolidhydrochlorid wurde in 0,5 ml Dichlormethan bei 0°C mit 0,12 mmol Z-N-Me-De-Leu-3-cyano-4,6-dimethyl-2-thiopyridylester und 0,12 mmol Triethylamin versetzt. Man rührte noch bei RT über Nacht und arbeitete wie folgt auf.

Man filtrierte zunächst das gelbe Thiopyridonderivat ab und trug das eingeeengte Filtrat auf eine kurze Kieselgelsäule auf. Überschüssigen Thiopyridylester entfernte man durch Spülen mit PE/EE = 7/3. Anschließend konnte das Produkt mit PE/EE = 2/8 eluiert werden. Das Thiopyridylester-freie Rohprodukt wurde dann in EE mit 10 %iger Zitronensäure, 1 N NaOH (Entfernung des restlichen Thiopyridons) und ges. Kochsalzlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft.

10 Nach Mitteldruckchromatographie (PE/EE = 3/7) erhielt man 62 mg (68,6 %) farblosen Feststoff.

Fp.: 102-103°C, DC (PE/EE = 3/7): $R_f = 0,25$;
[α]_D²⁰ = -113 (c = 0,9; CHCl₃);

15 Analog lassen sich (zum Teil unter Verwendung des entsprechenden Norstatinderivates und/oder des entsprechenden D-Tyrosin-Derivates und/oder von (2RS,4S)-Fluorenylmethyloxycarbonyl-aminoisovalerylpropionsäure und/oder von (2S)-2,3-Diaminopropansäure)
20 folgende Verbindungen der Formel I herstellen:

25

30

35

40

F: $X^1 = \text{NH}$, $X^2 = \text{O}$, $R^2 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{CH}_3$,
 $R^5 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$, S-Konfiguration

Nr.	R ¹
51	Boc-N-Me-D-Leu
52	Ac-Sarcosyl
53	CH ₃ CO
54	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO
55	CF ₃ CO
56	PhOCO
57	p-OH-Benzoyl
58	Z-N-Me-D-Ala
59	CH ₃ CH ₂ OCO-
60	Ac-Gly
61	Naphtalin-2-sulfonyl
62	N-Me-D-Val
63	Perfluorpropionyl
64	Boc
65	Ethyloxycarbonyl

G: $X^1 = \text{NH}$, $X^2 = \text{NH}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{CH}_3$,
 $R^5 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$, S-Konfiguration

Nr.	R ¹
66	CH ₃ -CO
67	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CO
68	Z-N-Me-D-Leu
69	Z-Sarcosyl

H: $X^1 = \text{NH}$, $X^2 = \text{NH}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{H}$, $R^4 = \text{CH}_3$,
 $R^5 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$, S-Konfiguration

Nr.	R ¹
70	CH ₃ CO
71	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO
72	Boc-N-Me-D-Leu
73	CF ₃ CO
74	p-OH-Benzoyl
75	Ac-Sarcosyl
76	C(CF ₃) ₂ OCO
77	PhOCO

I: $X^1 = \text{NH}$, $X^2 = \text{O}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{H}$, $R^4 = \text{CH}_3$,
 $R^5 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$,

Nr.	R ¹
78	CH ₃ CO
79	HCO
80	CH ₃ (CH ₂) ₄ CO
81	(CH ₃) ₃ CCO
82	CF ₃ CO
83	p-OH-Benzoyl
84	Z
85	Boc
86	Z-N-Me-D-Ala
87	Z-N-Me-D-Leu
88	Ac-Sarcosyl
89	PhOCO
90	C(CF ₃) ₂ OCO
91	CH ₃ CH ₂ OCO-N-Me-D-Leu
92	CF ₃ CH ₂ OCO
93	Naphthalin-1-sulfonyl
94	Naphthalin-2-sulfonyl
95	Perfluorheptanoyl

Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität wurde in einem weit verbreiteten Standardtestsystem für adhärente Zelllinien nach der Methode von Flick and Gifford (Kristallviolett-Assay) [J. Immunol. Meth., 1984; 68, 167-175] getestet. Als Zielzellen wurden die humanen Zelllinien CX-I (Kolonkarzinom), MX-I (Mammakarzinom) und LX-I (Lungenkarzinom) verwendet.

- 10 Die jeweiligen Zellen wurden in flachbödigen Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten in einer Zelldichte von $2-3 \times 10^3$ Zellen pro Kavität ausplattiert und 24 h unter Standardkulturbedingungen (RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % nicht-essentialen Aminosäuren) bei 37°C und 5 % CO₂/95 % Luft inkubiert.
- 15 wurden die Zellen weitere 72 h unter denselben Bedingungen, aber in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Test-Verbindungen inkubiert (Zellkontrollen nur in Medium). Die Quantifizierung der zytotoxischen Aktivität erfolgte nach Entfernung des Kulturmediums und damit der nicht-adhärenenten, toten Zellen. Die verbliebenen adhärenenten Zellen wurden 20 min mit 50 µl einer Kristallviolett-Färbelösung inkubiert und anschließend die Mikrotiterplatten kräftig mit Wasser gespült um den ungebundenen, wasserlöslichen Farbstoff zu entfernen.
- 20
- 25 Die verbliebenen wasserunlöslichen Farbkristalle wurden pro Kavität mit 100 µl einer Lösung, bestehend aus 50 % EtOH und 0.1 % Essigsäure, gelöst. Die Absorption jeder Kavität wurde mittels eines Mikrotiterplattenphotometers (Titertec, Multiscan, Flow Lab., Meckenheim, BRD) bestimmt und die halbmaximale Wirkkonzentration der jeweiligen Testsubstanz ermittelt.
- 30

In diesem Test zeigten die neuen Verbindungen eine gute zytotoxische Wirkung auf die getesteten menschlichen Tumorzelllinien.

35

40

Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität wurde in einem weit verbreiteten Standardtestsystem für adhärente Zelllinien nach der Methode von Flick and Gifford (Kristallviolett-Assay) [J. Immunol. Meth., 1984; 68, 167-175] getestet. Als Zielzellen wurden die humanen Zelllinien CX-I (Kolonkarzinom), MX-I (Mammakarzinom) und LX-I (Lungenkarzinom) verwendet.

- 5 Die jeweiligen Zellen wurden in flachbödigen Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten in einer Zelldichte von $2-3 \times 10^3$ Zellen pro Kavität ausplattiert und 24 h unter Standardkulturbedingungen (RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % nicht-essentialen Aminosäuren) bei 37°C und 5 % CO₂/95 % Luft inkubiert. Danach
- 15 wurden die Zellen weitere 72 h unter denselben Bedingungen, aber in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Test-Verbindungen inkubiert (Zellkontrollen nur in Medium). Die Quantifizierung der zytotoxischen Aktivität erfolgte nach Entfernung des Kulturmediums und damit der nicht-adhärenenten, toten Zellen. Die verbliebenen adhärenenten Zellen wurden 20 min mit 50 µl einer Kristallviolett-Färbelösung inkubiert und anschließend die Mikrotiterplatten kräftig mit Wasser gespült um den ungebundenen, wasserlöslichen Farbstoff zu entfernen.
- 20 Die verbliebenen wasserunlöslichen Farbkristalle wurden pro Kavität mit 100 µl einer Lösung, bestehend aus 50 % EtOH und 0.1 % Essigsäure, gelöst. Die Absorption jeder Kavität wurde mittels eines Mikrotiterplattenphotometers (Titertec, Multiscan, Flow Lab., Meckenheim, BRD) bestimmt und die halbmaximale Wirkkonzentration der jeweiligen Testsubstanz ermittelt.
- 25 30

In diesem Test zeigten die neuen Verbindungen eine gute zytotoxische Wirkung auf die getesteten menschlichen Tumorzelllinien.

35

40

Die in den Beispielen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutungen:

	Ac:	Acetyl
5	Äqv:	Äquivalent(e)
	BOC:	t-Butyloxycarbonyl
	BOP-Cl:	N,N-Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)amidophosphorsäurechlorid
	Dab:	(2S,3R)-Diaminobuttersäure
	DC:	Dünnschichtchromatographie
10	DCCD:	Dicyclohexylcarbodiimid
	DMAP:	N,N-Dimethyl-4-aminopyridin
	EE:	Essigsäureethylester
	Hip:	Hydroxyisovalerylpropionsäure
	Ist:	Isostatin
15	i.Vak.:	im Vakuum
	konz.:	konzentriert
	MCA:	Monochloracetyl
	NMR:	Nuclear Magnetic Resonance
	PE:	Petrolether
20	Tce:	Trichlorethyl
	RT:	Raumtemperatur
	TBDMS:	tert.-Butyl-dimethyl-silyl
	THF:	Tetrahydrofuran
	Z:	Benzylloxycarbonyl

25

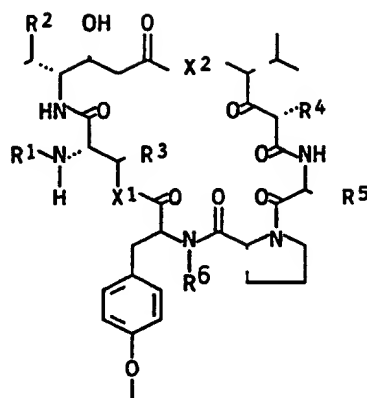
30

35

40

Patentansprüche

1. Peptide der Formel I



5

worin

X1 ein Sauerstoffatom oder eine NH-Gruppe,

X2 ein Sauerstoffatom oder eine NH-Gruppe,

R1 eine Aminoschutzgruppe, einen linearen, verzweigt-kettigen oder alicyclischen gesättigten oder ungesättigten aliphatischen, aliphatisch-aromatischen oder aromatischen Acylrest mit 1 bis 30 C-Atomen, der durch Fluor-, Nitro-, Oxo-, Hydroxy-, C₁-C₄-Alkoxy- oder eine gegebenenfalls geschützte Aminogruppe substituiert sein kann,

10

15

R2 ein Wasserstoffatom, eine Methyl- oder Ethylgruppe,

R3 ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe,

R4 ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe,

R5 ein Wasserstoffatom oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe und

R6 ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe

20

bedeuten, mit Ausnahme der Verbindungen, in denen gleichzeitig X1 und X2 Sauerstoffatome, R3 und R4 Methylgruppen, R5 eine Isopropylgruppe und R1 ein geschütztes oder freies N-Me-D-Leu bedeuten, sowie deren Salze mit physiologisch verträglichen Säuren.


25

2. Peptide der Formel I gemäß Anspruch 1 zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP 92/01304

International Application No

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. 5 C07K11/02; A61K37/02		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. 5	C07K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁹		
Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY vol. 34, no. 2, February 1991, WASHINGTON, USA pages 486 - 491; JOUIN ET AL: 'Antineoplastic activity of didemnin congeners' * See page 1, Scheme 1 - compound 6 * * Page 488-89, Conclusions * ---	1-2
A	SYNTHESIS April 1991, STUTTGART, GERMANY pages 294 - 300; SCHMIDT ET AL: 'Total synthesis of the Didemnins; IV. Synthesis of the peptolide ring and construction of the side chain' * See page 1 * --- -/-	1-2
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
19 AUGUST 1992	01.09.92	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE	KORSNER S.E. 	

7. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	<p>ANNUAL REPORTS IN MEDICINAL CHEMISTRY vol. 25, 1990, WASHINGTON, USA pages 195 - 204; CAUFIELD ET AL: 'Macrocyclic immunomodulators' * See pages 195-197 *</p> <p>---</p>	1-2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 92/01304

I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl.5	C07K11/02;	A61K37/02
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl.5	C07K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY Band. 34, Nr. 2, Februar 1991, WASHINGTON, USA Seiten 486 - 491; JOUIN ET AL: "Antineoplastic activity of didemnin congeners" * siehe Seite 1, Schema 1 - Verbindung 6 * * Seiten 488-489, Beschlüsse *	1-2
A	SYNTHESIS April 1991, STUTTGART, DE Seiten 294 - 300; SCHMIDT ET AL: "Total synthesis of the Didemnins; IV. Synthesis of the peptolide ring and construction of the side chain" * siehe Seite 1 *	1-2
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ : Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 19. August 1992 (19.08.92)	Abschließendatum des internationalen Recherchenberichts 01. September 1992 (01.09.92)	
Internationale Recherchenbehörde EUROPAISCHES PATENTAMT	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten KORSNER S.E.	

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>ANNUAL REPORTS IN MEDICINAL CHEMISTRY Band. 25, 1990, WASHINGTON, USA Seiten 195 - 204; CAUFELD ET AL: "Macrocyclic immunomodulators" * siehe Seiten 195-197 *</p>	1-2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.